Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts
der Universität Berlin.

Über das Verhalten von Enzymen im Hühnerei während der Bebrütung.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der

Medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

vorgelegt von

Ernst August Schütte

aus Bonn

am 31. Januar 1935

157

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. ~~Gocht~~ Magnus

Referent: Dr. Hinsberg

Korreferent: Prof. Rössle.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach dem Verhalten von Enzymen während der embryonalen Entwicklung von tierischen Organismen. Wir studierten das Problem an Hühnerembryonen. Dabei hatten wir den Vorteil, gleichmäßiges Ausgangsmaterial verwenden und jede beliebige Entwicklungsstufe untersuchen zu können.

Während über die enzymatischen Vorgänge beim Keimen von Pflanzensamen zahlreiche Studien vorliegen, besonders von *von Euler* in Gemeinschaft mit *Günther*, *Blix*, *Hellström*, *Burström* und *von Köhler*[1], sowie von *Linderström-Lang* und *Holter*[2], ist die Literatur über diesen Gegenstand noch recht spärlich. *Dahl*[3], *Mendel* und *Leavenworth*[4] studierten die Pankreasfermente beim Schweineembryo. Über den Enzymgehalt des Hühnerembryos haben *Herlitzka*[5], *Shaw*[6], *Pennington* und *Robertson*[7], *Wohlgemuth*[8] und *Koga*[9] gearbeitet, von denen die drei letztgenannten auch die Esterasen berücksichtigt haben. Neuere Arbeiten, die in näherer Beziehung zu unserer Frage stehen, sind leider in uns schwer zugänglichen Zeitschriften erschienen. So berichten *V. Engelhardt* und *Vaehner*[10] über die Lipase, Katalase und Peroxydase

---

[1] *H. v. Euler* u. *G. Günther*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **220**, 69, 1933; *H. v. Euler* u. *B. Blix*, ebenda **105**, 83, 1919; *H. v. Euler*, *Hellström*, *Burström* u. *v. Köhler*, ebenda **212**, 53, 1932. — [2] *K. Linderström-Lang* u. *H. Holter*, C. r. des Travaux du Laborat. Carlsberg **19**, Nr. 4, 1931; **19**, Nr. 6, 1932; **19**, Nr. 13, 1933; Zeitschr. f. physiol. Chem. **201**, 9, 1931; **204**, 15, 1932; **214**, 223, 1933; **215**, 167, 1933; Ergebn. d. Enzymforsch. III, 734. — [3] *Dahl*, Zentralbl. f. Physiol. **309**, 1891. — [4] *L. B. Mendel* u. *Ch. S. Leavenworth*, Amer. J. of Physiol. **21**, 95, 1907. — [5] *Herlitzka*, Arch. Ital. Biol. **48**, 119, 1907. — [6] *J. P. Shaw*, Amer. J. of Physiol. **31**, 439, 1913. — [7] *M. E. Pennington* u. *H. C. Robertson*, Jahresber. ü. Fortschr. d. Tierchem. **43**. — [8] *J. Wohlgemuth*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 540, 1905. — [9] *T. Koga*, diese Zeitschr. **141**, 430, 1923. — [10] *V. Engelhardt* u. *R. Vaehner*, Zeitschr. f. exper. Biol. **5**, 335, 1927 (russisch); Ber. f. d. ges. Physiol. **43**, 711.

im bebrüteten Hühnerei, *Remotti*[1] über die Proteasen und Lipasen, *Tateishi*[2] über die Carbohydrasen und *Rotini*[3] über die Amylase im Eiklar und Eigelb. Der Stoffwechsel des Hühnerembryos ist von *Liebermann*[4], *Baumgärtner*[5], *Bywater*[6] und in neuerer Zeit vor allem durch *Needham*[7] zum Gegenstand ausführlicher Arbeiten gemacht worden.

Die Angaben sind aber zum großen Teil widersprechend und zumeist auch ohne Zusammenhang mit den morphologischen Veränderungen gehalten, so daß es durchaus angebracht erschien, das Thema erneut in Angriff zu nehmen.

Im einzelnen fragten wir uns, ob im unbebrüteten Ei bereits Fermente vorhanden sind, in welchen Teilen sie vorkommen, ob sie erst während der Entwicklung des Keimlings auftreten und wie sie sich dabei qualitativ und quantitativ verhalten, oder ob lediglich Platzverschiebungen vorkommen. Dies schien uns auch in bezug auf die Frage der Verschiedenheit von Lipase und Esterase wichtig zu sein[8].

Wir haben zunächst einige Esterasen studiert und wenige Versuche über die Spaltung von Dipeptiden angestellt.

Die vorbereitende Untersuchung des Lipasegehaltes von Handelseiern beliebiger Herkunft ergab recht verschiedene Werte: in den meisten, anscheinend länger abgelagerten Eiern ließen sich überhaupt keine lipolytisch wirksamen Fermente nachweisen, in anderen fanden sie sich in sehr wechselnder Menge. Nun hat bereits *Liebermann* bei seinen Untersuchungen über den Stoffwechsel des Hühnerembryos festgestellt, daß das Verhältnis der verschiedenen chemischen Stoffe im Ei mit Herkunft und Gewicht der Eier sehr wechselt. Es liegt nahe, anzunehmen, daß in dem sicher erheblich labileren Fermenthaushalt der Eier dabei noch größere Schwankungen vorkommen. Es schien uns deshalb zuerst nötig, die Untersuchungen an Eiern gleicher Herkunft und gleichen Alters durchzuführen. Wir wählten frische Bruteier von der Rasse „Weiße amerikanische Leghorn", die wir, um Fütterungsunterschiede auszuschalten, von derselben Geflügelfarm bezogen. Die Tiere hatten dort reichlich Grünfläche als Auslauf, und Körnerfutter, Grünfutter und Magermilch als Nahrung. Das Durchschnittsgewicht der Eier betrug 50,0 ± 5,0 g. Die Bebrütung erfolgte in einem automatisch regulierten Brutofen, unter gleichmäßigen Bedingungen, was Temperatur, Feuchtigkeit und Umwendung anlangt.

---

[1] *E. Remotti*, Ric. Morf. **10**, 1, 1930; Ber. f. d. ges. Physiol. **60**, 251. — [2] *Sh. Tateishi*, Mitt. Med. Acad. Kioto **6**, 534 (japanisch u. deutsche Zusammenfassung); Ber. f. d. ges. Physiol. **68**, 456. — [3] *O. T. Rotini*, Ann. Labor. Ric. Ferment. Spallanzani **2**, 249, 1931; Ber. f. d. ges. Physiol. **70**, 768. — [4] *L. Liebermann*, Pflügers Arch. **43**, 71, 1888. — [5] *J. Baumgärtner*, Der Atmungsprozeß im Ei. Freiburg 1888. — [6] *N. W. Bywaters*, J. of Physiol. **45**, Proc. XL, 1913. — [7] *J. Needham*, Brit. J. exp. biol. **3**, 189, 1926; **4**, 114, 145, 1926; **4**, 258, 1927; **5**, 6, 27, 1927; Quart. j. of exp. physiol. **18**, 161, 1927; Chemical Embtyology. Cambridge, Univ. Press, 1931. — [8] Vgl. auch *R. Ammon* u. *W. Geisler*, Virchows Arch. **285**, 286, 1932; *R. Ammon* u. *E. Tabor*, diese Zeitschr. **267**, 26, 1933 und *H. Kraut* u. *W. v. Pantschenko-Jurewicz*, ebenda **275**, 114, 1934.

So war die Gewähr für weitgehende Einheitlichkeit des Materials gegeben. Bei unseren Fermentbestimmungen daran erhielten wir reproduzierbare und vergleichbare Werte.

Verschiedentlich ist darauf hingewiesen, daß der Fermentgehalt der Extrakte aus Hühnerembryonen und tierischen Organismen überhaupt größeren jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen ist. Unsere Untersuchungen erstreckten sich von Mitte Juni bis Mitte September. Innerhalb dieser Zeit erhielten wir bei Eiern gleichen Alters und gleicher Verarbeitung Werte von derselben Größenordnung, mit nur geringen Schwankungen um den Mittelwert.

Bereitung der Fermentpräparate.

Auf verschiedenen Wegen haben wir versucht, zu vergleichbaren Fermentpräparaten zu gelangen, die dabei in ihrer Wirkung genügend konstant blieben. Zuerst haben wir mit Trockenpulvern aus Eigelb und Eiklar gearbeitet, die nach der von *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz* gegebenen Vorschrift durch Behandeln mit Aceton und Äther hergestellt waren. Wir verfuhren dabei so, daß wir das Eigelb, das vom Eiklar möglichst sauber und vollständig abgetrennt worden war, in einer Reibschale unter ständigem Rühren mit der sechsfachen Raummenge Aceton versetzten und die sich bildenden Eiweißgerinnsel zerrieben. Nach halbstündigem Schütteln und weiter einstündigem Stehen wurde das abgesetzte Pulver abgenutscht, mit derselben Menge Aceton nochmals geschüttelt, filtriert, und weiter mit Aceton-Äthermischung und zweimal mit der doppelten Menge Äther entsprechend behandelt. Das so erhaltene fast farblose Pulver wurde zwischen Filtrierpapier getrocknet. Von einem 26 g schweren Dotter erhielten wir etwa 3,5 bis 4,0 g Pulver.

Mit dem Eiweiß wurde entsprechend verfahren. Von den Trockenpulvern stellten wir Extrakte mit 87%igem Glycerin her. 2 g Pulver wurden dazu mit 26,0 ccm Glycerin versetzt, 1 Stunde im Thermostaten bei 37° geschüttelt, weitere 7 Stunden zum Ausziehen stehengelassen, dann über Nacht durch ein Faltenfilter filtriert. Nochmalige Extraktion des Rückstandes, sowie längere Extraktion desselben Pulvers ergab, daß der Rückstand keine, wenigstens keine nennenswerten Mengen Lipase mehr enthielt. 1,0 ccm Extrakt entsprach 0,077 g Pulver.

Wir stellten ferner wäßrige, ammoniakalische Auszüge aus den Trockenpulvern her, indem wir 6 g Pulver mit 100,0 ccm n/40 Ammoniak 2 Stunden im Brutschrank bei 37,0° schüttelten, 15 Minuten bei 3000 Ø zentrifugierten, das Zentrifugat mit n/10 Essigsäure gegen Lackmus neutralisierten, und nach Abschleudern des entstandenen Niederschlags das opaleszente Zentrifugat als solches verwendeten, oder mit Toluol versetzt im Eisschrank aufbewahrten. 1,0 ccm Extrakt entspricht 0,05 g Pulver. Die Wirksamkeit der Extrakte prüften wir mit der unten näher bezeichneten gasvolumetrischen Methode. Dabei stellte sich heraus, daß die Pulver aus Gelbei eine deutlich meßbare und verwertbare lipolytische Wirkung besaßen, die aus dem Eiweiß dagegen vollkommen unwirksam waren. Ferner stellten wir fest, daß die ammoniakalischen Extrakte eine etwa dreimal stärkere Wirkung entfalteten als die Glycerinextrakte, wenn man die erhaltenen Umsätze auf die gleiche Menge Trockenpulver bezog.

Versuchsbeispiele. Vergleich der Wirkung von Trockenpulverextrakten bzw. Glycerinrohextrakten aus Gelbei und Weißei.

Glycerinextrakt aus Eigelb. Trockenpulverextrakt. Charge 60.

Wirkung auf Tributyrin . . . . 20,6 cmm/60 Minuten
„ „ Methylbutyrat . . 7,5 „ /60 „

Glycerinextrakt aus Eiweißtrockenpulver, Charge 60, zeigte keine meßbare Einwirkung auf die Substrate.

Glycerinrohextrakt aus Gelbei. Charge 60.

Wirkung auf Tributyrin . . . . 88 cmm CO_2/60 Minuten
„ „ Methylbutyrat . . 46 „ CO_2/60 „

Glycerinrohextrakt aus Eiweiß. Charge 60.

Wirkung auf Tributyrin . . . . 15,0 cmm CO_2/60 Minuten
„ „ Methylbutyrat . . 5,0 „ CO_2/60 „

Wirkung von Glycerinextrakten und Ammoniakextrakten aus Gelbeitrockenpulvern auf Tributyrin und Methylbutyrat.

Glycerinextrakt aus Pulver 63. 1,0 ccm entspricht 0,077 g Pulver.

Wirkung auf Tributyrin . . . . 20,6 cmm CO_2/60 Minuten
„ „ Methylbutyrat . . 7,5 „ CO_2/60 „

Ammoniakextrakt aus Pulver 63. 1,0 ccm entspricht 0,055 g P.

Wirkung auf Tributyrin . . . . 40,8 cmm CO_2/60 Minuten
„ „ Methylbutyrat . . 19,6 „ CO_2/60 „

Wie man sieht, verhalten sich die Wirkungen der Extrakte, ohne Berücksichtigung der Verschiedenheit der extrahierten Pulvermenge, wie 1 : 2 bzw. 1 : 2,6.

Geht man von den verschiedenen Werten aus, um den Gesamtgehalt des Gelbeies an Esterasen zu berechnen, so kommt man zu entsprechend weit auseinanderliegenden Werten. Bei Zugrundelegung des Glycerinextraktes enthält ein Dotter 45 Einheiten Tributyrinase (betr. der gewählten Einheit s. später), bei der des Ammoniakextraktes 126 Einheiten. Die Bestimmung mit dem Glycerinrohextrakt ergab einen Gehalt von 240 Esteraseeinheiten im Gelbei.

Bei vergleichender Untersuchung verschiedener Pulver aus gleichwertigen Eiern erhielten wir zum Teil ziemlich weit auseinanderliegende Werte. Um diese Unterschiede aufzuklären, haben wir geprüft, ob mit den bei der Acetonbehandlung von diesem aufgenommenen Lipoiden esterspaltende Enzyme extrahiert worden sind. Wir stellten fest, daß die nach Entfernung des Acetons durch Vakuumdestillation erhaltenen Rückstände auf Tributyrin und Methylbutyrat nicht einwirkten. Wir haben weiter untersucht, ob die Dauer der Aceton- bzw. Ätherwirkung von Einfluß auf die Wirksamkeit der Pulver ist. Diese Vermutung konnten wir durch unsere Versuche bestätigen: bei Abkürzung des Aceton-Ätherverfahrens erhielten wir erheblich wirksamere Pulver, wie das folgende Versuchsbeispiel zeigt. Aus diesem geht ferner hervor, daß die Tributyrinase erheblich empfindlicher gegen länger dauernde Behandlung mit Aceton und Äther ist als die Esterase. Wir glauben darin einen weiteren Hinweis auf eine tiefergehende Verschiedenheit zwischen Lipase und Esterase zu erkennen.

Versuchsbeispiel. Herstellung von Gelbeitrockenpulvern mit verschiedener Verarbeitungsdauer. Charge 70. Brutzeit: 66 Stunden.

Pulver 73. Verarbeitet zwei Eigelb (mit Keimscheibe) = 47,1 g.

Einwirkungszeit des Acetons . . . . . 135 Minuten
„ „ Aceton-Äthergemisches . . . . 25 „
„ „ Äthers . . . . . 35 „

Verarbeitungszeit insgesamt: 3 Stunden 15 Minuten. 7,3 g Pulver 73.

Pulver 73a. Verarbeitet ein Eigelb (mit Keimscheibe) = 22,9 g.

Einwirkungszeit des Acetons . . . . . 42 Minuten
„ „ Aceton-Äthers . . . . 18 „
„ „ Äthers . . . . . 15 „

Verarbeitungszeit insgesamt: 1 Stunde 15 Minuten. 3,4 g Pulver 73a.

Vergleich der lipatischen Wirksamkeit dieser Pulver.

Versuch 39. Glycerinextrakte aus Pulver 73 und 73a.

Pulver 73: Wirkung auf Tributyrin . . . 9,0 cmm CO_2/60 Minuten
„ „ „ Methylbutyrat . 5,0 „ CO_2/60 „
„ 73a: „ „ Tributyrin . . . 20,0 „ CO_2/60 „
„ „ „ Methylbutyrat . 5,5 „ CO_2/60 „

In ihrer tributyrinspaltenden Wirksamkeit verhalten sich die beiden Pulver ungefähr wie 1 : 2, in ihrer esteratischen wie 1 : 1,1.

Da wir nun aber nicht nur die Wirksamkeit der einzelnen Pulver und Extrakte — also die Enzymkonzentrationen —, sondern vor allem die in den verschiedenen Stadien in den Eiern enthaltenen Gesamtlipasemengen vergleichen wollten, ergaben sich für uns aus dem zahlenmäßig nicht erfaßbaren schädigenden Einfluß des Acetons und des Äthers auf das Ferment solche Unsicherheiten in der Verwertung unserer Ergebnisse, ganz abgesehen von der Schwierigkeit, kleinere Extraktmengen, z. B. aus Embryonen, ohne wesentlichen Verlust an Enzym zu Trockenpulver zu verarbeiten, daß wir für alle weiteren Versuche folgenden Weg einschlugen: Wir haben „Glycerinrohextrakte" durch Schütteln der Eidotter bzw. des Eiweißes oder des Organbreies mit der doppelten Gewichtsmenge 87 %igen Glycerins hergestellt. Diese Extrakte hielten nach zweistündigem Schütteln und weiterem dreistündigen Stehen im Thermostaten, im Eisschrank aufbewahrt, ihre enzymatische Wirkung über genügend lange Zeit konstant.

Bis zum fünften Bebrütungstage wurden die Embryonen mit dem Gelbei gemeinsam verarbeitet, vom sechsten Tage ab ließen sich Embryonen, Eihäute und Gelbei trennen, noch später, etwa vom zehnten Tage an, konnten Allantois und Dottersackmembran voneinander getrennt werden.

Die Eier werden geöffnet, indem man die Schale im obersten Viertel — am stumpfen Ende — abhebt. Dieser Teil enthält die sog. Luftkammer des Eies. Nach Öffnung der unter der Schale befindlichen weißen Haut ist der durchscheinende Amnionsack mit dem Embryo zu sehen. Durch Einstich mit der Pipette wird das Fruchtwasser entnommen. Dann wird der Embryo samt Allantois, Amnion und Dottersack herausgehoben, dieser abgesetzt, und der Embryo auf einem Uhrglas von Allantois und Amnion befreit. Der Dottersack wird entleert, sein Inhalt wie das Eigelb der unbebrüteten Eier zu Rohextrakt verarbeitet. Allantois und Dottersack werden mit der doppelten Gewichtsmenge Glycerin verrieben, nach mehrstündigem Digerieren im Thermostaten, im Eisschrank aufbewahrt. Die 8 Tage alten Embryonen wurden vor dem Versetzen mit Glycerin mit Sand zu einem homogenen Brei zerrieben. In noch späteren Stadien genügte

das nicht mehr, da dann die Knochen schon zu fest geworden sind. 15 Tage alte Embryonen haben wir deshalb durch die von *Latapie* angegebene Gewebsmühle getrieben und den erhaltenen Brei wie üblich weiterverarbeitet.

Versuchsbeispiel. Verarbeitung von zehn befruchteten Eiern. 10 Tage bebrütet. Charge 120. Die Verarbeitung erfolgte in drei Gruppen, die erste vier Eier, die beiden anderen je drei.

Charge 120[I]. Vier Eier.

Vier Embryonen: 12,05 g, mit 8,0 g Sand zerrieben, dann mit 24,10 g Glycerin versetzt, 5 Stunden Digerieren bei 37°.

Vier Dottersackmembranen: 9,85 g, mit 19,7 g Glycerin zu einem homogenen Brei zerrieben. Digerieren wie oben.

Vier Allantois: 7,28 g, mit 14,6 g Glycerin verarbeitet usw. Ferner wurde von zwei Eiern der Dottersackinhalt, das Fruchtwasser und das Eiweiß verarbeitet.

Bei allen Arbeiten wurde auf Einhalten steriler Bedingungen größter Wert gelegt. Zum Versuch wurden sämtliche Extrakte mit Ringer$_{(30)}$ auf das dreifache Volumen verdünnt und dann 20 Minuten bei 3000 Ø zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde als Fermentlösung sofort verwendet.

Substrate und Spaltungsmethode.

Wir haben sowohl die hydrolysierende als auch die esterifizierende Wirkung unserer Extrakte geprüft.

Als Substrate für unsere Spaltungsversuche benutzten wir: Tributyrin als Beispiel eines Triglycerids, Methylbutyrat als Beispiel eines einfachen Esters, und Acetylcholin, und unterscheiden entsprechend eine Tributyrinase, eine Esterase im engeren Sinne und eine Cholinesterase, die das Acetylcholinchlorid in Cholinchlorid und Essigsäure spaltet.

Zur Dipeptidhydrolyse benutzten wir Glycylglycin, Alanylglycin und Leucylglycin.

Die estersynthetisierende Kraft unserer Extrakte prüften wir an Buttersäure-Butylalkohol und Ölsäure-Butylalkohol, beide im butylalkoholischen Milieu, ferner an Buttersäure-Glycerin im Glycerinmilieu.

Die synthetisierende Wirkung unserer Extrakte wie auch unserer Trockenpulver war aber, auch mit relativ großen Pulvermengen, so gering, daß wir selbst nach tagelanger Versuchsdauer keine sicher verwertbaren Ausschläge bekamen. Wir haben in Verfolg dieser Fragen versucht, durch Anwendung von Adsorptionsmethoden zu reineren und konzentrierteren Enzymlösungen zu kommen. Doch waren die Einbußen an Ferment bei diesen Operationen an den kleinen, zur Verfügung stehenden Mengen zu groß. Wir haben dann weitere Versuche in dieser Richtung vor allem deshalb aufgegeben, weil bei diesen Operationen sich die ursprünglichen Bezugsgrößen derart verwischen, daß eine Beziehung der erhaltenen Werte auf die Ausgangsstoffe nicht mehr möglich war. Auf den Vergleich des Enzymgehalts dieser Ausgangsstoffe in den verschiedenen Stadien der Bebrütung kam es uns aber an. Wir haben uns deshalb auf die Messung der Hydrolysen beschränkt, für die genügend empfindliche Methoden zur Verfügung stehen.

Wir benutzten zum Nachweis der Esterasewirkung die gasvolumetrische Methode, die zuerst *Rona* und *Lasnitzki*[1] in Anlehnung an *Warburg*s Methode ausgearbeitet haben.

[1] *P. Rona* u. *A. Lasnitzki*, diese Zeitschr. **152**, 504, 1924; für die Cholinesterase *R. Ammon*, Pflügers Arch. **233**, 486, 1933.

Die großen Vorteile dieser Methode, die gerade für unsere Arbeit sehr ins Gewicht fielen, waren ihre große Empfindlichkeit und Genauigkeit, und die Möglichkeit, Reihenversuche anzustellen. Demgegenüber fällt der Nachteil, daß die optimalen Versuchsbedingungen nicht eingehalten werden können, die *Willstätter* für die vergleichende Lipasenbestimmung angegeben hat, nicht so ins Gewicht, da ja auch bei unserer Versuchsanordnung die für vergleichende Enzymbestimmungen wesentlichen Bedingungen konstant bleiben: Die Temperatur durch entsprechende Regulierung des Wasserbades, die Substratkonzentration dadurch, daß das Substrat stets im Überschuß vorhanden ist, die Wasserstoffionenkonzentration durch die Stärke des Kohlensäure-Bicarbonatpuffers, dessen Kapazität auch bei stärkerer Spaltung nur unwesentlich durchbrochen wird.

Was die Apparatur anlangt, so benutzten wir für unsere Versuche die *Nikolai*-Tröge, die es gestatten, Substrat und Ferment getrennt einzufüllen und zu einer beliebigen Zeit im Wasserbad zu mischen. Zum Verdünnen der Substrate und der Extrakte diente stets eine mit Natriumbicarbonat angereicherte Ringer$_{(30)}$-Lösung. Der Gasraum der Versuchsgefäße wurde mit einem Gemisch von 5% Kohlensäure in Stickstoff gefüllt.

Neben der fermentativen Substratspaltung bestimmten wir die Eigenhydrolyse der Substrate, die Gasentwicklung der Fermentlösungen und die Einwirkung durch Erhitzen inaktivierten Ferments auf die Substrate. Die Fermentlösungen allein zeigten ebenso wie die Versuche mit inaktiviertem Ferment keine Gasentwicklung. Die Eigenhydrolyse des Tributyrins ist so gering, daß sie, wie auch die des Methylbutyrats, unberücksichtigt bleiben kann. Die nicht unbeträchtliche Eigenverseifung des Acetylcholins wird vom Hauptversuch abgezogen.

Als Maß der enzymatischen Wirkung nahmen wir die in der Stunde entwickelte Menge CO_2 in cmm. Wir ermittelten diesen Wert zunächst zeichnerisch. Nachdem die Spaltungskurven bei Anwendung sowohl von Tributyrin als auch Acetylcholin stets einen linearen Verlauf über mehrere Stunden zeigten und befriedigende Deckung der Kurven bei Versuchen gleicher Zusammensetzung vorhanden war, haben wir die Werte später durch Rechnung ermittelt. Kontrollen ergaben eine befriedigende Übereinstimmung mit den zeichnerischen Werten. Bei der Methylbutyratspaltung wurde nur der erste lineare Teil des Verlaufs verwertet und auf eine Versuchszeit von 60 Minuten bezogen. Die Spaltungskurven bei der Methylbutyrathydrolyse biegen nämlich nach Erreichung eines bestimmten Umsatzes um, d. h. der Lipolysequotient ändert sich wahrscheinlich infolge Vergiftung des Enzyms durch den entstehenden Methylalkohol.

Versuch 50 als Beispiel eines Hauptversuchs. Wirkung des Extraktes von 10 Tagen bebrüteten Hühnerembryonen auf Tributyrin und Methylbutyrat. Charge 100.

Fermentlösung: Glycerinrohextrakt von Embryonen mit dem doppelten Volumen Ringer$_{(30)}$ verdünnt und zentrifugiert, wie oben angegeben.

Substrate: 0,5 ccm Tributyrin bzw. Methylbutyrat in 37,5 ccm Ringer$_{(30)}$. Endkonzentration bei Versuchsbeginn 1%.

Volumen der Versuchsflüssigkeit $V_F = 2{,}0$ ccm. Versuchstemperatur 37,52° C. Gasmischung: 5% CO_2 und 95% N_2.

Ansätze: Trog 1 und 8: 1,5 ccm Tributyrinlösung + 0,5 ccm Ferment. Trog 10 und 13: 1,5 ccm Methylbutyratlösung + 0,5 ccm Ferment. Trog 44: 1,5 ccm Ringer$_{(30)}$ + 0,5 ccm Ferment. Trog 29: 2,0 ccm Ringer$_{(30)}$

(Thermobarometer). Trog 6: 1,5 ccm Tributyrinlösung + 0,5 ccm Fermentlösung, durch 55 Minuten Erhitzen im kochenden Wasser inaktiviert. Das Ferment wurde stets in den Anhang, das Substrat in den Trog selbst eingefüllt. Nachdem Temperaturausgleich eingetreten war, was meist 10 Minuten nach dem Einsetzen ins Wasserbad der Fall war, wurden Ferment und Substrat durch Kippen der Gefäße gemischt und mit den Ablesungen begonnen.

Abb. 1 gibt diesen Versuch wieder. Die Eigenhydrolyse der Substrate wurde hier nicht mehr bestimmt, da sie durch vorhergegangene Versuche genügend bekannt war. Trog 44 und Trog 6 zeigten keine Gasentwicklung. Das Thermobarometer schwankte während des Versuchs um 2,6 mm Brodie um die Mittellage. Bei rechnerischer Ermittlung der Stundenvolumina ergibt sich für Trog 1 ein Mittel von 137 cmm, für Trog 8 ein solches von 134 cmm CO_2/60 Minuten, mit einem Durchschnittswert von 135,5. Aus Trog 10 und 13 entsprechend ein Durchschnittswert von 20 cmm. Der Vergleich mit den Werten der Zeichnung ergibt gute Übereinstimmung der verschiedenen Ergebnisse.

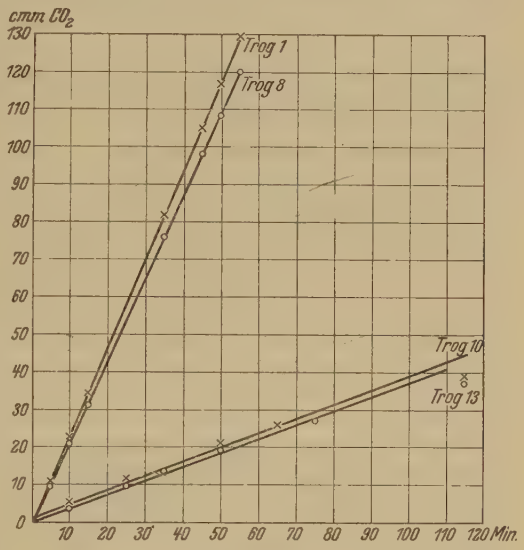

Abb. 1.

Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Stundenumsätze verschiedener Extrakte ist natürlich die Gleichartigkeit der Herstellung und die Prüfung unter konstanten Bedingungen. Diese Notwendigkeiten haben wir, wie aus den methodischen Angaben hervorgeht, erfüllt.

Bei der Beziehung der gefundenen Umsätze auf die Einheit des ursprünglichen Extraktes machen wir zwei Voraussetzungen. Einmal die, daß im Sediment der verdünnten Extrakte keine nennenswerten Enzymmengen festgehalten werden, sondern daß die gesamte Enzymmenge im Zentrifugat gleichmäßig verteilt ist. Diese Annahme war berechtigt; denn wiederholte Extraktion des Sedimentes ergab keine lipolytische Wirkung desselben. Die andere Voraussetzung ist die einer unmittelbaren Proportionalität zwischen Extraktkonzentration und enzymatischer Wirkung. Die verdünnten Extrakte waren aber verhältnismäßig stärker wirksam als die nicht verdünnten. Bei der Beziehung auf den ursprünglichen Extrakt unter Annahme einer unmittelbaren Proportionalität begehen wir also einen Fehler. Da dieser aber in alle Berechnungen gleichmäßig eingeht, wird die Beziehung der verschiedenen Endergebnisse aufeinander davon nicht berührt.

Unseren Vergleichen legen wir folgende Maße zugrunde: W ist der Wirkungsgrad, ausgedrückt in cmm CO_2/60 Minuten, bezogen auf 1,0 ccm des ursprünglichen Extraktes. W ist also ein Ausdruck für die Konzentration

des Enzyms im betreffenden Gewebe. G ist der Gesamtgehalt eines Extraktes bzw. Eies oder Eiteiles an Enzym, ausgedrückt in „Einheiten", bezogen auf die Gesamtmenge des Extraktes. Von 1 Einheit Esterase sprechen wir, wenn in 1 Stunde unter den geschilderten Versuchsbedingungen 1 Mikromol Fettsäure abgespalten wird.

Wir haben ferner die Methylbutyratspaltung mit der Tributyrinspaltung bei den verschiedenen Extrakten verglichen, um festzustellen, ob die verschiedenen Esterasen sich in der Entwicklung gleich verhalten, oder ob Unterschiede in der Vermehrung der einzelnen Faktoren vorliegen. Wir nennen das Verhältnis Methylbutyratspaltung zu Tributyrinspaltung $m : b$, wobei für die Spaltungen die jeweiligen Größen von W eingesetzt werden. Wie schon oben erwähnt, haben wir den Enzymgehalt der Eier nicht auf das jeweilige Trockengewicht, sondern auf Frischgewichte bezogen. Für unsere Fragestellung schien uns eine Beziehung auf das Trockengewicht entbehrlich.

Wir haben den Esterasengehalt von $2^1/_2$, 5, 6, 8, 10 und 15 Tagen bebrüteten Eiern untersucht. Ferner den von unbebrüteten befruchteten und unbefruchteten, sowie von bebrüteten unbefruchteten. Bevor wir unsere Ergebnisse mitteilen, sollen einige Ausführungen über die morphologische Entwicklung in diesen verschiedenen Stadien gemacht werden.

Entwicklungsgeschichtliches.

Es handelt sich bei den Hühnereiern um polardifferenzierte, dotterreiche Eier, bei denen die Entwicklung des Embryos von einer umschriebenen Keimscheibe ausgeht. Nach $2^1/_2$tägiger Brutzeit ist bereits eine weitgehende Differenzierung innerhalb der drei Keimblätter eingetreten. Das embryonale Blutgefäßsystem kommt am dritten Tage mit dem Beginn der Herzpulsation zu einem gewissen vorläufigen Abschluß. Der extraembryonal gelegene Gefäßhof mit den Blutbildungsinseln ist fertig ausgebildet. Zu gleicher Zeit findet die Abfaltung des embryonalen Körpers vom außerembryonalen Bezirk der Keimblätter statt, durch die Ausbildung der Rumpf- und Darmfalten, wodurch es zugleich zur Bildung des Darmrohres und zur Absetzung des Embryos von der Dotterkugel kommt.

Durch die Resorption des Dotters, die in den späteren Stadien der Entwicklung unter Ausbildung von Zotten erfolgt, wird der Dottersack immer kleiner. Der Rest wird am Ende der Brutzeit durch den Darmnabel in den Rumpf des Hühnchens aufgenommen. Ebenfalls am dritten Tage kommt es durch das Emporwachsen der Amnionfalten zur Ausbildung des den Embryo umgebenden Amnionsackes und der serösen Hülle, die unmittelbar unter der Eimembran weiterwachsend, den im Amnionsack eingeschlossenen Embryo samt Dottersack umgreift. Am fünften Tage ist der Amnionsack durch die gebildete Flüssigkeit vom Embryo abgedrängt. Im ersten Stadium der Entwicklung dient dem Embryo der Dottersackkreislauf außer für die Resorption des Nahrungsdotters auch als Atmungsorgan. Mit seiner zunehmenden Schrumpfung kann er jedoch der Atmungsfunktion nicht mehr genügen, vielleicht auch, weil in den späteren Entwicklungsstadien der Sauerstoffbedarf entsprechend dem größeren Energieumsatz ein erheblich gesteigerter sein wird. Dann tritt die Allantois an seine Stelle, die am vierten Bruttage durch den Bauchnabel hindurch in die außerembryonale Höhle hinein zu wachsen beginnt. Sie breitet sich unmittelbar unter der serösen Hülle bis zum spitzen Eipol aus. Da sie reichlich mit Blutgefäßen versehen ist, kann sie bei ihrer oberflächlichen Lage ihrer

Atmungsfunktion gut genügen. Damit ist das embryonale System im Prinzip fertig und alle wesentlichen Organe sind angelegt. Am fünften Tage ist der Embryo etwa 8 mm lang. Die Augen sind als dunkle, stecknadelknopfgroße Scheiben erkennbar. In dem durchscheinenden Körper sieht man das pulsierende Herz. Die 15 Tage alten Embryonen füllen das Ei bereits ziemlich aus. Vom Dotter und Eiweiß sind nur noch geringe Reste vorhanden. Die Haut ist mit einem Flaum bedeckt. Die Ausbildung ist im wesentlichen beendigt.

Versuchsergebnisse.

Untersuchungen an unbebrüteten Eiern.

Zunächst war für uns die Frage zu klären, ob bereits im unbebrüteten Ei Esterasen vorkommen, und in welchen Teilen und welcher Größenordnung sie gegebenenfalls nachzuweisen sind. Zu dieser Frage liegen die erwähnten Beiträge von *Wohlgemuth* und *Koga* vor. *Wohlgemuth* untersuchte den Fermentgehalt von frischen Hühnereiern mit autolytischen Methoden und stellte dabei im Gelbei ein proteolytisches und ein lipolytisches Ferment fest, das im Eiweiß fehlt. *Koga*, der seine Untersuchungen auch auf bebrütete Eier ausdehnte, benutzte zum Nachweis der lipatischen Wirkung die alkalimetrische Bestimmung der frei gewordenen Fettsäuren. Er fand im Gelbei erheblich mehr Monobutyrase als im Eiweiß, dagegen keine Tributyrinase, die er aber im Eiweiß zu finden glaubte.

Im Gegensatz zu *Koga* fanden wir bei Einwirkung von Glycerinrohextrakt aus dem Gelbei eines unbebrüteten Eies auf Tributyrin eine deutliche Spaltung. Der Wirkungsgrad W betrug für die Tributyrinase 88, für die Esterase 46. Bei Einwirkung auf Tributyrin wird also die doppelte Menge Buttersäure in Freiheit gesetzt, wie bei der auf Methylbutyrat.

Der Gesamtgehalt des Gelbeies war 240 Einheiten Tributyrinase und 125 Einheiten Esterase.

Der Gehalt des Eiweißes an Lipasen ist im Vergleich zum Eigelb sehr gering. Wir fanden für das Eiweiß derselben Eier für die Tributyrinase $W = 15$, $G = 24$ Einheiten, für die Esterase $W = 5$, $G = 8$ Einheiten. Diese Mengen bewegen sich hart an der Nachweisbarkeitsgrenze und sind entsprechend eher als zu hoch anzusehen.

Untersuchungen an bebrüteten, unbefruchteten Eiern.

Zum Vergleich haben wir den Lipasegehalt von 5 Tage bebrüteten, unbefruchteten Eiern bestimmt. Wir fanden im Durchschnitt für ein Gelbei 230 Einheiten Tributyrinase, $W = 70$, und 135 Einheiten Esterase, $W = 43$. Wir sehen also, daß die Bebrütung als solche keine Veränderungen bei den Esterasen verursacht.

Tabelle I. Veränderungen der Tributyrinase.

Charge	Bruttage	Gelbei		Weißei		Embryo		Dottersack		Allantois		Gesamtgehalt des Eies	Vielfache der Anfangsmenge
		W	*G*	*W*	*G*	*W*	*G*	*W*	*G*	*W*	*G*		
60	0	88	240	15	24							264	1×250
70	$2^1/_2$	87	240									—	1×250
90	5	105	351	15	25							376	$1{,}5 \times 250$
110^{I}	6	102	310			183	12	1010	131	*	*	453	$1{,}8 \times 250$
110^{II}	6	103	310			213	14	1010	142	*	*	466	
50	8	117	660	17	23	765	132	*	*	*	*	815	$3{,}3 \times 250$
100	10	66	274			820	380	3070	568	528	95	1316	$4{,}5 \times 250$
120^{I}	10					695	276	920	267	122	15	828	
120^{II}	10					840	345	1740	372	110	21	1008	$= 1100$
120^{III}	10					860	339						
130^{I}	15	198	—			1750	1974	1480	1078	430	50	3102	12×250
130^{II}	15					1080	1450	1425	951	231	22	2422	$= 2800$

* Bei Charge 50 wurden Dottersackhaut und Allantois mit dem Gelbei zusammen verarbeitet.

Tabelle II. Veränderungen der Esterase.

Charge	Bruttage	Gelbei		Embryo		Dottersack		Allantois		Gesamtgehalt des Eies	Vielfache der Anfangsmenge
		W	*G*	*W*	*G*	*W*	*G*	*W*	*G*		
60	0	46	125							132	1×100
70	$2^1/_2$	36	99							100	1×100
90	5	30	91							100	1×100
110^{I}	6	35	—	53	3,5	300	39	*	*	136	1×100
110^{II}	6			55	3,6	285	37	*	*	135	
100	10	31	65	120	56	510	96	112	20	237	
120^{I}	10			162	64	168	49	30	4	(183)	3×100
120^{II}	10					542	220	16	3	(348)	
130^{I}	15			460	622	360	250	88	9	(881)	
130^{II}	15	45	—	770	864			94	11	1125	10×100

* Dottersackhaut und Allantois wurden zusammen verarbeitet.

Untersuchungen an bebrüteten, befruchteten Eiern.

Bei der Bebrütung befruchteter Eier nehmen die Lipasen an Menge mächtig zu. Wie aus Tabelle I hervorgeht, beträgt der Gehalt an Tributyrinase am fünften Tage das $1^1/_2$fache der Anfangsmenge, am 6. fast das Doppelte, am 8. das Dreifache, am 10. das Fünffache, am 15. das Zwölffache. Bei der Esterase steigt der Gesamtgehalt bis zum 15. Tage auf das Zehnfache, bei der Cholinesterase auf das Achtfache des Anfangswertes an.

Wir fragten uns nun, in welchem Maße die einzelnen Teile des embryonalen Systems an dieser Zunahme beteiligt sind. Wir haben diese Verhältnisse in Tabelle I für die Tributyrinase, in Tabelle II für die Esterase, in Tabelle III für die Cholinesterase zusammengestellt. Man findet dort unter *W* wieder den Wirkungsgrad, unter *G* den Gesamtgehalt des betreffenden Extraktes.

Aus Tabelle I sehen wir, daß sich der Wirkungsgrad der Tributyrinase im Eigelb, d. h. ihre Konzentration, während der Bebrütung nicht erheblich ändert. Ob die größere Wirksamkeit des Gelbeiextraktes nach 15tägiger Brutzeit mit der in diesem Stadium sehr schnell fortschreitenden Dotterresorption zusammenhängt und eine Folge der Einengung des Eigelbs, oder einer stärkeren Durchsetzung desselben mit Ferment von seiten der Dottersackmembran ist, oder ob die technische Schwierigkeit, den mit Zotten stark durchsetzten Dotter frei von solchen Gewebsteilen zu bekommen, dafür verantwortlich zu machen ist, wagen wir nicht zu entscheiden. Das Gewicht des Dotters nimmt bis zum 10. Tage nur wenig, um etwa 5 g, dann aber erheblich schneller ab. Am 11. Tage wiegt der Dotter im Durchschnitt nur noch 8,5 g, am 13. 4,0 g. Für die Berechnung des Gesamtlipasegehalts des Eies spielt in diesem Stadium die geringe Dottermenge keine Rolle mehr.

Der bei den unbebrüteten Eiern ja sehr geringe Lipasengehalt des Eiweißes bleibt auch in den späteren Untersuchungen von zu vernachlässigender Größe, die sich hart an der Fehlergrenze der Methode bewegt.

Der Wirkungsgrad des Embryonalextraktes, in den ersten 6 Tagen kaum größer als der des Eigelbs, nimmt mit dem stärkeren Wachstum des Embryos in den fortgeschritteneren Stadien, in denen es zu einer schnellen Vergrößerung der inneren Organe und damit wohl auch zu einem umfangreichen embryonalen Stoffwechsel kommt, mächtig zu. Die im Embryo enthaltene Gesamtmenge erreicht aber erst in der zweiten Hälfte der Brutzeit Werte, die für den Lipasegehalt des Eies ausschlaggebend sind.

Den größten Wirkungsgrad weisen die Extrakte aus Dottersackmembran auf. Sie erreichen den 30fachen Wert der Eigelbextrakte von unbebrüteten Eiern, so daß die in ihnen enthaltene Lipasenmenge,

trotz dem geringen Gewicht der Membran gegenüber den anderen Bestandteilen, zeitweilig bis zur Hälfte der Gesamtmenge ausmacht.

Der Gehalt der Allantois ist gegenüber dem der Dottersackmembran als gering zu bezeichnen. Immerhin erreichen die Extrakte Wirkungsgrade, die das Vier bis Fünffache der Gelbeiextrakte betragen.

Die Prüfung des Fruchtwassers ergab zuerst wechselnde Werte. Durch Einstich mit der Pipette gewonnenes reines Fruchtwasser hatte selbst in unverdünntem Zustande eine so geringe tributyrinspaltende Wirkung, daß dieselbe, als innerhalb der Fehlergrenze liegend, nicht verwertbar ist. Die in den vorhergehenden Untersuchungen gefundenen Spaltungen beruhten wohl auf Verunreinigung mit Blut und Dotter.

Das Ergebnis unserer Tributyrinaseuntersuchung befindet sich als Ganzes genommen in Übereinstimmung mit den Befunden von *Pennington* und *Robertson*, welche beim Bebrüten befruchteter Eier eine starke Zunahme an Lipase fanden.

Die Befunde von *Koga* konnten wir nicht bestätigen. Wir fanden im Gegenteil, daß auch die Tributyrinase ganz überwiegend im Eigelb enthalten ist, und dort, soweit man nur das Eigelb in Betracht zieht, wenig, aber deutlich in ihrer relativen Wirkung zunimmt. Betrachtet man das Geschehen in der gesamten Keimanlage, so ist die Zunahme eine ganz beträchtliche.

Die Verteilung der Esterase auf die verschiedenen Teile des embryonalen Systems zeigt Tabelle II. Hier finden wir im Eigelb eine deutliche, wenn auch geringe Abnahme der Wirksamkeit im Laufe der Bebrütung. Die methylbutyratspaltende Wirkung des Eiweißes ist kaum verwertbar. Im Embryonalextrakt zeigt die Esterase ein ähnliches Verhalten wie die Tributyrinase. Auffallend ist, daß die Esterase im Dottersackhautextrakt nicht die Zunahme zeigt wie die Butyrinase. Während diese dort das 30fache der Wirkung des unbebrüteten Gelbeies erreicht, kommt die Esterase kaum auf das 15fache. In der Allantois liegen die Verhältnisse wieder ähnlich wie bei der Tributyrinase.

Tabelle III. Veränderungen der Cholinesterase.

Charge	Brut-tage	Gelbei		Embryo		Dottersack		Allantois		Gesamt-gehalt des Eies	Vielfache der Anfangsmenge
		W	*G*	*W*	*G*	*W*	*G*	*W*	*G*		
70	$2^1/_2$	96	265							260	1×260
90	5	96	294							300	1×260
110	6			392	25	162	21	*	*	350	1×260
50	8			1340	270					550	2×260
120^{I}	10			1170	475			84	10		
120^{II}	10			1050	415	138	30				
			450		445		30		10	900	$3{,}5 \times 260$
130^{I}	15	294	600	1070	1200	120	87	108	13	1900	8×260
130^{II}	15	—	—	1120	1500	180	123	185	18	2241	

* Dottersackhaut und Allantois wurden zusammen verarbeitet.

Tabelle III zeigt die Zunahme der Cholinesterase. Die Wirkungen sind hier von Anfang an größer und nehmen auch im Eigelb während der Bebrütung erheblicher zu. Besonders auffällig ist, daß die Cholinesterase, ganz im Gegensatz zur Tributyrinase, in der Dottersackmembran kaum höhere Werte erreicht als im Eigelb und in der Allantois, daß vielmehr ihre wesentliche Zunahme auf den wachsenden Embryo selbst beschränkt ist. Die Cholinesterase der Extrakte ist durch Physostigmin vergiftbar, d. h. 0,01 mg in $V_F = 2$ ccm hemmt die fermentative Wirkung total[1]. Der an dem Ferment so reiche Embryonalextrakt ließ sich auch zum Nachweis einer enzymatischen Acetylcholinsynthese benutzen[2].

Zur Frage der Verschiedenheit von Tributyrinase, Esterase und Cholinesterase interessierte uns, ob sie alle zur gleichen Zeit während der Bebrütung zunehmen. Für Butyrase und Esterase schien uns der Quotient $m : b$ diese Verhältnisse am besten zu verdeutlichen. Wir haben die Quotienten für die verschiedenen Bruttage und Teile in Tabelle IV zusammengestellt. Für die Cholinesterase verzichteten wir auf die Aufstellung des entsprechenden Quotienten, weil ihr abweichendes Verhalten ohne weiteres in die Augen springt.

Tabelle IV. Verhältnis $m : b$.

Charge	Bruttage	Gelbei	Embryo	Dottersack	Allantois
60	0	1 : 1,6			
70	$2^1/_2$	1 : 2			
90	5	1 : 3,8			
110	6		1 : 3,8	1 : 3,6	1 : 3,6
100	10	1 : 6	1 : 7	1 : 6	1 : 5
120^{I}	10	1 : 3	1 : 4,3	1 : 5,5	1 : 4,3
120^{II}	10			1 : 3,5	1 : 5
130	15	1 : 4,5	1 : 2,5	1 : 4	1 : 3

Das Verhältnis $m : b$ ist beim unbebrüteten Ei und im Beginn der Brutzeit 1 : 2, bis zum 10. Tage verschiebt es sich zugunsten der Tributyrinase, und erreicht bei einer der 10tägigen Chargen den Wert 1 : 6 bis 1 : 7. Dann geht es wieder zurück, um bei den 15tägigen Chargen Werte von 1 : 2,5 bis 1 : 4 zu erreichen. Es fällt auf, daß diese Verschiebung in allen Teilen stattfindet, also nicht nur im Dottersackextrakt oder nur im Embryonalextrakt. In bezug auf die absoluten Größen der Zunahmen ist die Verschiebung natürlich im Dottersackhautextrakt am stärksten. Ferner ist der Quotient bei den verschiedenen Teilen desselben Extraktes von ziemlich gleichem Wert, während

[1] Vgl. auch *R. Ammon*, Pflügers Arch. **233**, 486, 1933. — [2] *R. Ammon* u. *H. Kwiatkowski*, ebenda **234**, 269, 1934.

zwischen verschiedenen Eiern gleichen Stadiums breitere Schwankungen vorkommen.

Aus der Wertänderung des Quotienten im Laufe der Entwicklung sehen wir, daß die Zunahme der Butyrase bis zum 10. Tage etwa doppelt so groß ist wie die der Esterase. Und die Tatsache, daß der Quotient sich später wieder dem Ausgangswert nähert, legt den Schluß nahe, daß in der zweiten Hälfte der Entwicklung die Esterase verhältnismäßig stärker zunimmt, trotzdem auch die Butyrasevermehrung in diesem Stadium eine gewaltige ist.

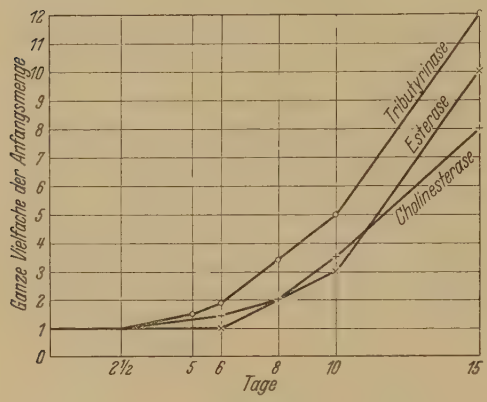

Abb. 2.

In Abb. 2 haben wir die Zunahmen der verschiedenen Lipasen zeichnerisch dargestellt. Auf der Abszisse haben wir die Bruttage, auf der Ordinate ganze Vielfache der Anfangsmenge als Einheiten aufgetragen, wobei wir den jeweiligen Gesamtgehalt des unbebrüteten Eies = 1 gesetzt haben.

Wie verhalten sich nun die Zunahmekoeffizienten der einzelnen Enzyme in den verschiedenen Teilen des embryonalen Systems zueinander? Bei Besprechung der Tabellen I, II und III wurde im einzelnen schon darauf hingewiesen, in welchen Teilen des embryonalen Systems die Hauptzunahmen der Butyrinase, Esterase und Cholinesterase liegen.

Tabelle V. Verhältnis des Gesamtgehaltes der Dottersackmembran zum Gesamtgehalt des Ganzeies.

Charge	Bruttage	Tributyrinase	Esterase	Cholinesterase
110	6	1 : 3,5	1 : 3,6	1 : 15
120	10	1 : 2	1 : 2,8	1 : 30
130	15	1 : 3	1 : 4	1 : 15

Aus der Verbindung dieser Befunde mit denen der Tabellen IV und V ergibt sich folgendes:

Die Tributyrinase zeigt schon früh eine sichere Vermehrung ihrer aktiven Menge, die zunächst ganz überwiegend im Gewebe der Dottersackmembran lokalisiert ist, und dort eine ganz außerordentliche

Konzentration erfährt, die später wieder nachläßt. Vielleicht ist es so, daß in dem Maße, wie das Schwergewicht des embryonalen Stoffwechsels mit der Ausbildung der inneren Organe aus der Dottersackhaut in diese gelegt wird, wobei wir vor allem an die Leber denken, auch die Lipasen ihren Sitz wechseln.

Die Esterase zeigt gegenüber der Tributyrinase ein späteres Einsetzen der Enzymvermehrung, die von vornherein ihren Sitz mehr im Embryo als in der Dottersackhaut hat. Wir erinnern uns dabei der Tatsache, daß es auch im erwachsenen tierischen Organismus die ausgesprochenen Organesterasen der Leber sind, die gegenüber niederen Estern vom Typ des Methylbutyrats eine besondere Aktivität entfalten und stellen fest, daß die Vermehrung der Esterase beim bebrüteten Ei hauptsächlich in jene Zeit fällt, in der ein besonders starkes Wachstum der Leber stattfindet.

Die Cholinesterase ist in der Dottersackhaut nur spärlich vertreten, trotzdem sie im Gelbei schon zu Beginn stärker wirksam ist als die Tributyrinase, und sie zeigt noch weit ausgesprochener als die Esterase eine schon frühe Lokalisation ihrer Zunahme im Embryonalextrakt. Aus Tabelle IV gehen diese Verhältnisse deutlich hervor.

Wir haben außer den Esterasen auch die Dipeptidasen in unsere Untersuchung einbezogen. Wir prüften die dipeptidspaltende Wirkung unserer Extrakte an den oben erwähnten Substraten und bestimmten den frei gewordenen Aminostickstoff titrimetrisch nach *Lindertsröm-Lang*[1]. Wir konnten aber in den Glycerinextrakten aus Eigelb weder bei bebrüteten noch bei unbebrüteten Eiern, auch unter mannigfachster Variation der Bedingungen, keine dipeptidspaltende Wirkung feststellen, wohl aber in den Embryonal- und Dottersackhautextrakten. Damit konnten wir nur die Ergebnisse von *Borger* und *Peters*[2] bestätigen, die unter anderen Gesichtspunkten die Enzyme des Embryonalextraktes studiert haben. Wir möchten jedoch aus der Tatsache, daß im Eigelb keine Dipeptidasen nachzuweisen waren, nicht ohne weiteres den an sich vielleicht naheliegenden Schluß ziehen, daß sich dieses Enzym erst mit stärkerem Gewebswachstum neu bildet. Denn es erscheint nicht ausgeschlossen, daß sich mit verfeinerten Methoden auch in früheren Stadien der Entwicklung proteolytische Enzyme nachweisen lassen.

Es sind noch einige Fragen zu erledigen, die für unser Ergebnis von Bedeutung sind. Die eine, ob es sich bei den Enzymvermehrungen nicht lediglich um eine Verlagerung des Ferments aus dem Gelbei in den Embryo und seine Anhänge handelt, können wir auf Grund der

[1] *K. Linderström-Lang*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **173**, 32, 1927. — [2] *G. Borger* u. *T. Peters*, ebenda **214**, 91, 1933.

quantitativen Auswertung unserer Versuche durch Beziehung der jeweiligen Wirksamkeit auf das Frischgewicht des Ausgangsorgans als erledigt betrachten. Die Größe der Zunahmen liegt weit außerhalb des Bereichs der möglichen Meßfehler. Daß die Zunahmen Folge der Entwicklung eines Embryos und nicht der Bebrütung an sich sind, haben wir bereits oben gezeigt. Die andere Frage, ob der Fermentgehalt des untersuchten Organs nicht von der zufällig in diesem mitverarbeiteten Blutmenge abhängig ist, können wir ebenfalls verneinen, da die Allantois, obgleich sie infolge ihres Gefäßreichtums kaum blutfrei verarbeitet werden konnte, an enzymatischer Wirksamkeit hinter der weit blutärmeren Dottersackhaut zurückbleibt.

Fragen wir nun nach der Bedeutung der Enzymvermehrung während der Entwicklung des Hühnerembryos. Dient sie nur einer Fermentspeicherung als Vorbereitung auf das extraovale Leben, oder finden schon innerhalb des Eies fermentative Hydrolysen statt?

Zu dieser Frage liegen mehrere ältere Arbeiten vor, die sich mit der chemischen Seite der Entwicklung befassen. So fand *Liebermann* (l. c.), daß die Trockensubstanz des Eiinhalts während der Brutzeit um fast ein Drittel abnimmt, wobei die Gesamtmenge der Mineralbestandteile ziemlich unverändert bleibt. Die ätherlöslichen Substanzen schwinden um fast die Hälfte, die stickstoffhaltigen um ein Viertel der Anfangsmenge. Der Wasserverlust macht ungefähr ein Fünftel des ursprünglichen Eigewichts aus. Trotzdem enthält das reife Hühnchen im Ei mehr Wasser, als das ebenso erwärmte, gleichschwere unbefruchtete Ei. Außerdem verbraucht der Embryo Sauerstoff, von dem ihm nur ein Teil wieder als Kohlensäure verläßt. *Liebermann* schloß aus diesen Befunden, daß im bebrüteten, befruchteten Ei bereits ein Energiestoffwechsel stattfindet, wobei sowohl Fett als auch Eiweiß unter O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe verbraucht werden, und wobei es zur intermediären Wasserneubildung kommt. In den Vordergrund des initialen chemischen Geschehens stellte er die Hydrolyse der Fette und äußerte schon damals die Vermutung, daß es sich dabei im wesentlichen um fermentative Vorgänge handeln möge.

Über den Atmungsprozeß des bebrüteten Eies hat erstmalig *Baumgärtner* (l. c.) gearbeitet, der feststellte, daß bei der Bebrütung befruchteter Eier eine O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe stattfindet, die bei unbebrüteten Eiern nicht vorhanden ist, und daß dabei dem Embryo lange vor Beginn der Lungenatmung eine entscheidende Rolle zufällt. Einen weiteren Beitrag zum Stoffwechsel des bebrüteten Hühnereies lieferte *Bywaters* (l. c.), der bei bebrüteten, befruchteten Eiern eine schnelle Abnahme des Zuckers fand, was bei unbefruchteten Eiern nicht der Fall war. Dazu würde die Beobachtung von *Koza* (l. c.) passen, daß sich nämlich die Diastase des Eies bei der Bebrütung vermehrt.

Aus den Ergebnissen dieser verschiedenen Arbeiten und unserer eigenen Versuche kommen wir zu der Auffassung, daß die Entwicklung des Embryos mit einer starken Vermehrung von Enzymen und einer Koordination von Fermentationen verbunden ist. Ob diese aber das Primum movens sind oder selbst nur eine Folge der geweblichen Organi-

sation der lebenden Masse, können wir heute noch nicht entscheiden, da sich die wesentlichen Sprünge in der Enzymvermehrung, die im ersten Beginn der Entwicklung liegen, dem Nachweis durch unsere Methoden einstweilen entziehen.

Zusammenfassung.

Es wird das Verhalten der Esterasen im Hühnerei während der Bebrütung in qualitativer und quantitativer Hinsicht unter Berücksichtigung der morphologischen Entwicklung des Embryos studiert.

Entsprechend den angewandten Substraten unterscheiden wir eine Tributyrinase, eine einfache Esterase (Methylbutyrase) und eine acetylcholinverseifende Cholinesterase.

Es wird die absolute und relative Zunahme dieser Enzyme während der Bebrütung in den verschiedenen Teilen des embryonalen Entwicklungssystems, sowie die Änderung im Gesamtbestand des Eies untersucht.

Es werden einige unter denselben Gesichtspunkten angestellte Versuche über den Dipeptidasegehalt der Eier mitgeteilt. Die Ergebnisse werden, unter Heranziehung der Literatur, unter dem übergeordneten Gesichtspunkt des embryonalen Stoffwechsels und der Bedeutung der Enzyme für die Entwicklung gewürdigt.

Lebenslauf.

Ich, Ernst August Schütte, wurde am 14. Juni 1908 in Bonn a. Rhein als Sohn des 1913 verstorbenen Dr. med. Rudolf Schütte, Oberarzt an der Provinzial-Heil- und Pflegeanstalt in Bonn, und seiner Ehefrau Antonie, geb. Mosebach geboren. Ich bin deutscher Staatsangehörigkeit und evangelischer Konfession.

Die Reifeprüfung bestand ich im März 1927 am Deutschen Kolleg in Godesberg. Fünf vorklinische Semester studierte ich an der Universität in Bonn, wo ich Ende des Sommersemesters 1929 die ärztliche Vorprüfung bestand. Von den klinischen Semestern studierte ich drei in München und drei in Berlin. Dort legte ich im Winter 1932/33 die ärztliche Staatsprüfung ab. In meinen letzten Semestern studierte ich nebenbei noch Chemie und machte im Sommer 1933 den ersten Teil der Chemischen Verbandsprüfung. Die Approbation als Arzt erhielt ich am 31. März 1934.

Die vorliegende Arbeit fertigte ich im Sommer 1933 als Medizinalpraktikant an der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin an, wo ich unter der Leitung von Herrn Professor Rona bereits während meines Studiums chemisch und physiologisch-chemisch gearbeitet hatte.

Mein Studium führte ich mit der Hilfe der Studienstiftung des Deutschen Volkes durch.